

Dott. Francesca Niceta

CONTRIBUTO ALLA TECNICA PER LO STUDIO DELLE UOVA DEGLI INSETTI

Una delle prime difficoltà che si presentano a chi si accinge allo studio delle uova degli insetti è spesso la natura e lo spessore del guscio, il quale ostacola fortemente le più comuni e necessarie operazioni della tecnica microscopica, e specialmente la penetrazione ed evaporazione dei liquidi durante l'inclusione in paraffina, e più ancora le sezioni al microtomo.

È noto che il guscio delle uova degli Insetti è composto di una sostanza che, se da alcuni studiosi è ritenuta diversa dalla cheratina (Tichomiroff dà ad essa il nome di *corionina*), tuttavia molto assomiglia alla cheratina stessa. Infatti, se su una lamina di platino arroventata si pongono dei gusci di uova di Insetti, si sente subito l'odore caratteristico di corna ed unghie bruciate che è proprio della cheratina. Cosicché è ormai generalmente ammessa per il corion delle uova di insetti una natura cheratica.

E poichè il guscio cheratico, quando abbia notevole spessore, presenta il grave inconveniente che l'imparaffinamento riesce male o non riesce affatto, e quando anche riesce, le uova incluse non sono sezionabili al rasojo del microtomo, una delle prime operazioni da farsi sulle uova dopo la fissazione e indurimento in alcool, è quella di liberarle dal guscio.

Con lo sviluppo degli studi di embriologia degli Insetti, diversi sono stati i metodi seguiti per tale importante operazione, dalla quale dipende sempre il buon esito di tutte le manipolazioni successive.

Grandori adoperava il metodo dello sgusciamiento delle uova a mano ⁽¹⁾, facendolo aderire su paraffina e dilacerando o fondendo il guscio e poi allontanandolo per mezzo di speciali finissimi aghi, operando sotto il microscopio binoculare. Una tale operazione, se ha il vantaggio di dare l'assoluta certezza che la struttura cellulare dei tessuti interni non viene minimamente alterata, tuttavia, anche quando una certa pratica si è acquistata nella delicatissima operazione, esige grande dispendio di tempo, obbliga spesso a sculpare notevole parte del materiale, e soprattutto mette alla più dura prova anche la pazienza del più autentico cortosino.

Non mancarono perciò tentativi rivolti ad ottenere il rammolimento del corion con mezzi chimici, rendendolo permeabile e seccionabile senza doverlo materialmente allontanare.

I primi tentativi, fondati sull'azione corrodente di alcali forti sulla cheratina, non hanno condotto a buoni risultati perchè tali sostanze corrodenti agiscono alterando irrimediabilmente la delicata struttura dei tessuti interni.

Pigermi e Grandori nel 1920 riferirono ⁽²⁾ intorno all'azione solvente esercitata dal solidrato di calcio sul guscio cheratico delle uova di lusetti. Adoperando tale sostanza sul guscio delle uova di Bombicini e di *Orgyia antiqua*, e lasciandola agire per circa 20 ore (su materiale già fissato con miscela cromoacetica), Grandori otteneva un'ottima corrosione del guscio, e « alle sezioni si rileva che tutte le parti dell'uovo restano assolutamente inalterate anche nei più fini dettagli istologici ».

Ma la preparazione del solidrato di calcio, ottenuta facendo gorgogliare H_2S per parecchie ore in una poltiglia semifiuida di $Ca(OH)_2$, non è certo operazione piacevole in un laboratorio biologico dove generalmente non si possiede una cappa, e dove quindi tale preparazione diffonde le emanazioni puzzolenti di H_2S che persistono per due o tre giorni.

(1) GRANDORI REMO. — Lo sguscio cheratico dei Baci da seta. — Annuario della R. Stazione Racologica di Padova, 1914.

(2) PIGERMI LUIGIO e GRANDORI REMO. — Azione del solidrato di calcio sul guscio delle uova dei Lepidotteri. — Rend. Acc. Lincei, Vol. XXIX, serie 5.a, 1.° sem., fasc. 8, 1920.

Inoltre il solfidrato di calcio si dimostra efficace come decheratinizzante se usato appena preparato o entro pochi giorni; ma poi, anche se conservato al bujo, si decompone spontaneamente e va perdendo totalmente la sua efficacia.

Riflettendo che il Pigorini aveva pensato di ricorrere al solfidrato di calcio perchè ricordava che questo composto ha azione solvente sulla sostanza cheratica dei peli dei mammiferi, per analogia ho voluto provare se la stessa azione solvente potesse essere esercitata anche dal *rusma*, sostanza che in Oriente viene adoperata come depilatorio.

Allo scopo, ho preparato del *rusma*, mescolando una parte (in peso), di orpimento con 5 parti di ossido di calcio in polvere, ed ho cominciato col seppellire nella massa pulverulenta così ottenuta alcune uova di *Bombyx mori*; indi versai sopra la massa stessa dell'acqua bollente in quantità doppia del peso del *rusma* adoperato. Ottenevo così una reazione molto vivace, con formazione di un precipitato grigiastro, con svolgimento di vapori dall'odore nauseante simile a quello del solfidrato di calcio. Rimescolando cautamente le uova entro la poltiglia così formatasi, dopo solo due minuti trasportavo le uova stesse — aspirandole con una pipetta — in acqua, e potevo subito osservare che i gusci si erano completamente rammolliti e in alcune uova erano anche stati completamente asportati, non ritrovandosene che dei residui in forma di laminette molli e giallognole.

Le uova restano così denudate, o quasi, del guscio cheratico, e dopo qualche lavaggio per un paio d'ore in acqua distillata (senza sottoporle all'azione di acqua corrente, che può danneggiare con urti le uova nude e delicatissime), sono pronte per tutte le successive manipolazioni della tecnica dell'inclusione in paraffina.

Le prove sono state da me fatte:

1) su uova di *Bombyx mori* vive, di razza Majella, allo stato ibernante (29 dicembre 1928);

2) su uova di *Bombyx mori*, di razza Gran Sasso, che già erano state fissate con miscela cromoacetica il 5 gennaio 1928, ed avevano soggiornato per un anno in alcool a 70°.

Dalle prove della prima serie ho rilevato che il *rusma* agisce sulle uova anche da ottimo fissatore; dalle prove della seconda serie ho rilevato che per rammollire il guscio delle

uova già fissate è opportuno lasciare che il rusma eserciti la sua azione almeno per 10 minuti primi, mentre per le uova vive bastano solo due minuti primi perchè esso agisca da ottimo fissatore e decheratinizzatore insieme.

Quel che soprattutto interessa in tutte queste prove si è che la struttura intima dei tessuti interni non viene menomamente alterata anche nei più fini particolari. Intatta si mantiene la sierosa, che in sezione mostra le sue cellule fornite di nucleo allungato, i cui granuli di cromatina si tingono in modo perfettamente normale con l'ematossilina Carazzi; i granuli e le sfere vitelline si presentano perfettamente integri nei loro contorni e in tutti i particolari, ed anche il plasma presenta coi colori plasmatici consueti (Orange G., Rosso Congo) una reazione tutt'affatto normale. Inalterati si presentano altresì gli elementi ectodermici e mesodermici della stria germinale (fig. 1).

Sia nell'uno che nell'altro caso, cioè dal rusma applicato su materiale vivo e applicato su materiale già fissato, mi sono preoccupata di confrontare le sezioni di uova trattate con quelle ottenute da uova nelle stesse condizioni di ibernamento e sgusciate a mano. La fig. 2 dimostra che non vi è alcuna differenza fra l'uovo trattato a vivo col rusma e quello sgusciato a mano; se nella fig. 1 sembra che le sfere vitelline siano in uno stato di più netta e completa individualizzazione che non nel caso della fig. 2, ciò non significa certo che il rusma possa essere un conservatore delle strutture ancor migliore del fissativo cromoacetico; bensì, come gli studiosi dell'argomento ben sanno, si tratta di variazioni normali nello stato di aggregazione delle sfere stesse.

La fig. 3 dimostra che il rusma, anche quando sia applicato su materiale fissato non altera minimamente le strutture cellulari del vitello e dell'embrione; ho stimato superfluo riprodurre un altro preparato di confronto, perchè tutti gli studiosi di embriologia del bombice riconosceranno perfettamente normale la struttura rappresentata nella detta figura, in base alle pubblicazioni già esistenti in materia. La stessa piega che la stria germinale presenta a livello della regione toracica è un fatto normale che per le uova ibernanti è già conosciuto.

Concludendo, il metodo di decheratinizzazione mediante il rusma mi sembra possa entrare nell'uso ordinario della tecnica

